



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Gebrauchsmusterschrift**
⑩ **DE 202 06 153 U 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
G 02 B 21/18

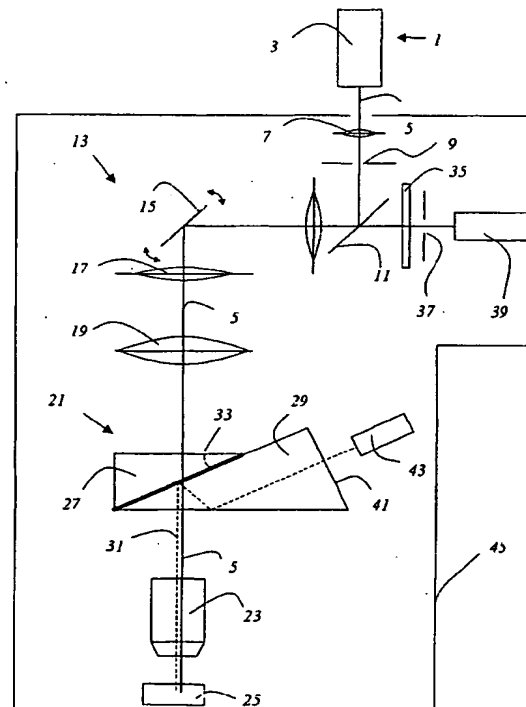
②1 Aktenzeichen: 202 06 153.1
②2 Anmeldetag: 19. 4. 2002
④7 Eintragungstag: 27. 6. 2002
④3 Bekanntmachung
im Patentblatt: 1. 8. 2002

DE 202 06 153 U 1

⑦3 Inhaber:
Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 68165
Mannheim, DE

⑤4 **Scanmikroskop mit Mikroskopstativ**

⑤7 Scanmikroskop mit einem Mikroskopstativ, mit einer Lichtquelle, die einen Beleuchtungslichtstrahl zur Beleuchtung einer Probe emittiert, mit einer in dem Mikroskopstativ angeordneten Strahlableitvorrichtung zum Scannen des Beleuchtungslichtstrahles über die Probe, mit einem Objektiv, das den Beleuchtungslichtstrahl auf die Probe fokussiert, und mit mindestens einem Detektor, der von der Probe ausgehendes Detektionslicht empfängt, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der Probe und dem Detektor ein Bauernfeindprisma vorgesehen ist.



DE 202 06 153 U 1

19.04.02

Scanmikroskop mit Mikroskopstativ

Die Erfindung betrifft ein Scanmikroskop mit einem Mikroskopstativ, mit einer Lichtquelle, die einen Beleuchtungslichtstrahl zur Beleuchtung einer Probe emittiert, mit einer in dem Mikroskopstativ angeordneten
5 Strahlablenkeinrichtung zum Scannen des Beleuchtungslichtstrahles über die Probe, mit einem Objektiv, das den Beleuchtungslichtstrahl auf die Probe fokussiert, und mit mindestens einem Detektor, der von der Probe ausgehendes Detektionslicht empfängt.

In der Scanmikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um
10 das von der Probe emittierte Detektionslicht, als Reflexions- oder Fluoreszenzlicht, zu beobachten. Der Fokus eines Beleuchtungslichtstrahles wird mit Hilfe einer steuerbaren Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Probenebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so daß ein Spiegel in x-,
15 der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkipfung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt kommenden Detektionslichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung
20 ausgerüstet.

Speziell in der konfokalen Scanmikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahles in drei Dimensionen abgetastet.

Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sog.
25 Anregungsblende – fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine

Hf

DE 2002 06 153 U1

19.04.02

Strahlableitenrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht
5 gelangt über die Strahlableitenrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Diese Detektionsanordnung wird Descan-Anordnung genannt. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die
10 Detektionsblende nicht, so daß man eine Punktinformation erhält, die durch sequentielles Abtasten des Objekts mit dem Fokus des Beleuchtungslichtstrahles zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatennahme erzielt. Kommerzielle Scanmikroskope bestehen meist aus einem Scanmodul, dass
15 an das Stativ eines klassischen Lichtmikroskops angeflanscht wird, wobei das Scanmodul alle genannten zur Abrasterung einer Probe zusätzlich nötigen Elemente beinhaltet.

Kommerzielle Scanmikroskope beinhalten meistens ein Mikroskopstativ, wie es auch in der konventionellen Lichtmikroskopie verwendet wird. In der Regel
20 sind insbesondere konfokale Scanmikroskope auch als konventionelle Lichtmikroskope verwendbar. In der konventionellen Fluoreszenzauflichtmikroskopie wird aus dem Licht einer Lichtquelle, beispielsweise einer Bogenlampe, mit Hilfe eines Farbfilters, dem sog. Anregungsfilter, der Anteil in den mikroskopischen Strahlengang eingekoppelt,
25 der den gewünschten Wellenlängenbereich zur Fluoreszenzanregung aufweist. Die Einkopplung in den Strahlengang des Mikroskops erfolgt mit Hilfe eines dichroitischen Strahlteilers, der das Anregungslicht zur Probe reflektiert, während er das von der Probe ausgehende Fluoreszenzlicht weitgehend ungehindert passieren lässt. Das von der Probe rückgestreute
30 Anregungslicht wird mit einem Sperrfilter zurückgehalten, der für die Fluoreszenzstrahlung jedoch durchlässig ist. Die optimale Kombination aufeinander abgestimmter Filter und Strahlteiler zu einem leicht

Hf

DE 202 08 153 U1

19.04.02

austauschbaren modularen Filterblock ist seit langem üblich. Meist sind die Filterblöcke in einem Revolver innerhalb des Mikroskops, als Teil sog. Fluoreszenz-Auflichtilluminatoren, angeordnet, so dass ein schneller und einfacher Austausch ermöglicht ist.

- 5 In der konfokalen Scanmikroskopie kann im Falle der Zweiphotonenanregung (oder Mehrphotonenanregung) auf eine Detektionsblende verzichtet werden, da die Anregungswahrscheinlichkeit vom Quadrat der Photonendichte und damit vom Quadrat der Beleuchtungslichtintensität abhängt, die naturgemäß im Fokus viel höher ist als in den Nachbarregionen. Das zu detektierende
- 10 Fluoreszenzlicht stammt daher mit großer Wahrscheinlichkeit zum aller größten Teil aus der Fokusregion, was eine weitere Differenzierung von Fluoreszenzphotonen aus dem Fokusbereich von Fluoreszenzphotonen aus den Nachbarbereichen mit einer Blendenanordnung überflüssig macht.

- Insbesondere vor dem Hintergrund einer ohnehin geringen Ausbeute an
- 15 Fluoreszenzphotonen bei Zweiphotonenanregung ist eine Non-Descan-Anordnung, bei der das Detektionslicht nicht über die Strahlableitvorrichtung (Descan-Anordnung) und den Strahlteiler zur Beleuchtungslichteinkopplung zum Detektor gelangt, sondern direkt nach dem Objektiv mit Hilfe eines dichroitischen Strahlteilers ausgelenkt und detektiert wird, interessant; denn
- 20 im Allgemeinen geht auf diesem Detektionslichtweg weniger Licht verloren. Außerdem tragen bei der Zweiphotonenanregung mit Descan-Detektion gestreute Anteile des Detektionslichtes wesentlich zum Signal bei, was bei Non-Descan-Detektion nur in wesentlich verringertem Maße eine Rolle spielt. Anordnungen dieser Art sind beispielsweise aus der Veröffentlichung von
- 25 David. W. Piston et al. „Two-photon-excitation fluorescence imaging of three dimensional calcium-ion activity“, Applied Optics, Vol. 33, No. 4, Feb 1996, und aus Piston et al: „Time-Resolved Fluorescence Imaging and Background Rejection by Two-Photon Excitation in Laser Scanning Microscopy“, SPIE Vol. 1640 bekannt.

- 30 Aus der U.S.-Patentschrift US 6,169,289 B1 ist ein Mikroskop mit Mehrphotonenanregung bekannt, bei dem das von der Probe ausgehende Detektionslicht kondensorseitig detektiert wird.

Hf

DE 202 08 153 U1

19.04.02

Ein Problem der bekannten Anordnungen besteht darin, zur Non-Descan-Detektion, dass der Strahlteiler zur Auslenkung des Detektionslichtes aus dem mikroskopischen Strahlengang viel Bauraum, insbesondere entlang des mikroskopischen Strahlenganges, beansprucht, so dass dieser oft nicht in
5 gängigen Mikroskopstativen untergebracht werden kann. Oft sind massive bauliche Veränderungen des Scanmikroskops und insbesondere des Mikroskopstativs erforderlich, um eine Non-Descan-Detektion zu erreichen.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine Scanmikroskop vorzuschlagen, bei dem die aufgezeigten Probleme gelöst sind.

10 Obige Aufgabe wird durch ein Scanmikroskop gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass zwischen der Probe und dem Detektor ein Bauernfeindprisma vorgesehen ist.

Die Erfindung hat den Vorteil, dass eine Non-Descan-Detektion auch bei Mikroskopen mit Standard-Mikroskopstativen ermöglicht ist.

15 In einer bevorzugten Ausgestaltung definiert die Probe eine Probenebene, die eine Beleuchtungsseite und eine Durchlichtseite festlegt. Das Bauernfeindprisma kann sowohl auf der Beleuchtungsseite, als auch auf der Durchlichtseite angeordnet sein. Insbesondere bei Anwendungen, die einen durchlichtseitigen Detektor erfordern, ist die Erfindung von besonderem
20 Vorteil, da der Fuß der gängigen Mikroskopstative in der Regel besonders wenig Bauraum bietet.

In einer anderen bevorzugten Ausgestaltung weist mindestens eine Fläche des Bauernfeindprismas eine farbselektive Beschichtung auf. Diese Beschichtung kann beispielsweise als dichroitischer oder dichromatischer
25 Filter ausgeführt sein. Bei Beleuchtungsseitiger Anordnung des Bauernfeindprismas ist die Beschichtung so gewählt, dass der Beleuchtungslichtstrahl das Prisma weitgehend unbeeinflusst passiert, während das Detektionslicht von der Schicht reflektiert und zum Detektor gelenkt wird.

30 In einer bevorzugten Ausgestaltung ist das Bauernfeindprisma achromatisch, wodurch unterschiedliche Strahlwege für Licht unterschiedlicher Farbe

Hf

DE 2002 08 153 U1

19.04.02

vermieden sind, was insbesondere bei der Beleuchtungsseitigen Anordnung des Bauernfeindprismas von Vorteil ist, wenn das Scanmikroskop gleichzeitig in Non-Descan-Detektion und Descan-Detektion betrieben wird.

5 In einer Ausgestaltungsform weist das Bauernfeindprisma mindestens ein Eintrittsfenster und mindestens ein Austrittsfenster auf, auf die das Detektionslicht mit unterschiedlichem Einfallswinkel trifft. Ebenso trifft das Beleuchtungslicht in dieser Ausführungsform bei beleuchtungsseitiger Anordnung des Bauernfeindprismas mit unterschiedlichen Einfallswinkeln auf das Eintritts- und Austrittsfenster.

10 In einer ganz besonders bevorzugten Ausgestaltung ist der Detektor innerhalb des Mikroskopstativs angeordnet.

In einer Ausführungsvariante ist das Bauernfeindprisma zum Umschalten von Descan-Detektion auf Non-Descan-Detektion von außen in den Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengang einbringbar, wobei Führungselemente, wie
15 Führungsschienen, Gleitschienen oder eine Bajonettfassung, vorgesehen sind, die ein einfaches und zuverlässiges Einbringen und Positionieren ermöglichen. Weiterhin sind Anschlagelemente vorgesehen, die eine Arbeitsposition des Bauernfeindprismas definieren und die derart ausgestaltet sind, dass das positionierte Bauernfeindprisma automatisch in Bezug auf den
20 Detektionsstrahlengang justiert ist und nach der Positionierung keine weitere Justierung des Bauernfeindprismas erforderlich ist.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben, wobei gleich wirkende Elemente mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigen:

- 25 Fig. 1 eine erfindungsgemäßes Scanmikroskop,
Fig. 2 ein weiteres erfindungsgemäßes Scanmikroskop.

Fig. 1 zeigt schematisch ein erfindungsgemäßes Scanmikroskop. Das von einer Lichtquelle 1, der als modenverkoppelter Titan-Saphir-Laser 3
30 ausgeführt ist, kommende Beleuchtungslichtstrahl 5 weist eine Wellenlänge

19.04.02

von ca. 800 nm auf und wird von der Optik 7 auf die Anregungsblende 9
fokussiert, um anschließend vom einem Strahlteiler 11 zur
Strahlableitrichtung 13, die einen kardanisch aufgehängten Spiegel 15
beinhaltet, reflektiert zu werden. Durch die Scanoptik 17, die Tubusoptik 19,
5 das Bauernfeindprisma 21 und das Objektiv 23, wird der
Beleuchtungslichtstrahl 5 über bzw. durch die Probe 25 geführt. Zwischen der
Tubusoptik 19 und dem Objektiv 23 befindet sich das Bauernfeindprisma 21,
das ein erstes Prisma 27 und ein zweites Prisma 29 beinhaltet und das zur
Auskopplung des von der Probe ausgehenden Detektionslichtes 31 dient. Das
10 zweite Prisma weist auf der dem ersten Prisma zugewandten Seite eine
dichroitische Beschichtung 33 auf, die den Beleuchtungslichtstrahl 5 passieren
lässt, das in der Wellenlänge verschobene Detektionslicht reflektiert. Das
Detektionslicht 31 gelangt bei Descan-Detektion über die
Strahlableitrichtung 13 zurück zum Strahlteiler 11, passiert diesen, den
15 Sperrfilter 35, der die Reststrahlung vom Anregungslicht unterdrückt und die
Detektionsblende 37 und trifft anschließend auf den Descan-Detektor 39. Zur
Descan-Detektion wird das Bauernfeindprisma 21 vorzugsweise aus dem
Strahlengang entfernt. Die Beschichtung kann jedoch auch so ausgelegt sein,
dass Detektionslicht, das aus einer Zweiphotonenanregung zum Detektor 43
20 reflektiert wird und Detektionslicht aus einer Einphotonenanregung das
Bauernfeindprisma 21 ungehindert passiert. Im zweiten Prisma 29 gibt es eine
Totalreflexion an der Hypotenusenfläche, bevor das Detektionslicht das
Prisma durch das Austrittsfenster 41 verlässt und auf den Detektor 43 trifft. Es
ist auch denkbar, dass mehrere Totalreflexionen stattfinden, wenn es nötig ist
25 das Detektionslicht weiter zu transportieren; hierzu müsste das zweite Prisma
vergrößert werden. Es könnte auch direkt in einen Lichtleiter münden. Das
Scanmikroskop ist mit Ausnahme der Lichtquelle 1 vollständig in ein
Mikroskopstativ 45 eingebaut.

Fig. 2 zeigt ein weiteres erfindungsgemäßes Scanmikroskop, bei dem das
30 Bauernfeindprisma 21 und der Detektor 43 auf der Durchlichtseite angeordnet
sind.

Hf

DE 202 06 153 U1

19.04.02

7

Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

5

Hf

DE 202 06 153 U1

19.04.02

Bezugszeichenliste:

	1	Lichtquelle
	3	Titan-Saphir-Laser
5	5	Beleuchtungslichtstrahl
	7	Optik
	9	Anregungsblende
	11	Strahlteiler
	13	Strahlablenkeinrichtung
10	15	Spiegel
	17	Scanoptik
	19	Tubusoptik
	21	Bauernfeindprisma
	23	Objektiv
15	25	Probe
	27	Prisma
	29	Prisma
	31	Detektionslicht
	33	Beschichtung
20	35	Sperrfilter
	37	Detektionsblende
	39	Detektor
	41	Austrittsfenster
	43	Detektor
25	45	Mikroskopstativ

Hf

DE 2002 06 153 U1

19.04.02

Schutzansprüche

1. Scanmikroskop mit einem Mikroskopstativ, mit einer Lichtquelle, die einen Beleuchtungslichtstrahl zur Beleuchtung einer Probe emittiert, mit einer in dem Mikroskopstativ angeordneten Strahlableitvorrichtung zum
5 Scannen des Beleuchtungslichtstrahles über die Probe, mit einem Objektiv, das den Beleuchtungslichtstrahl auf die Probe fokussiert, und mit mindestens einem Detektor, der von der Probe ausgehendes Detektionslicht empfängt, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der Probe und dem Detektor ein Bauernfeindprisma vorgesehen ist.
- 10 2. Scanmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe eine Probenebene definiert, die eine Beleuchtungsseite und eine Durchlichtseite festlegt, und dass das Bauernfeindprisma auf der Beleuchtungsseite angeordnet ist.
- 15 3. Scanmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe eine Probenebene definiert, die eine Beleuchtungsseite und eine Durchlichtseite festlegt, und dass das Bauernfeindprisma auf der Durchlichtseite angeordnet ist.
- 20 4. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Fläche des Bauernfeindprismas eine farbselektive Beschichtung aufweist.
5. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Bauernfeindprisma achromatisch ist.
- 25 6. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Bauernfeindprisma ein Eintrittsfenster und ein Austrittsfenster aufweist, auf die das Detektionslicht mit unterschiedlichem

Hf

DE 202 08 153 U1

19.04.02

10

Einfallswinkel trifft.

7. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor innerhalb des Mikroskopstativs angeordnet ist.

5

Hf

DE 2002 06 153 U1

19.04.02

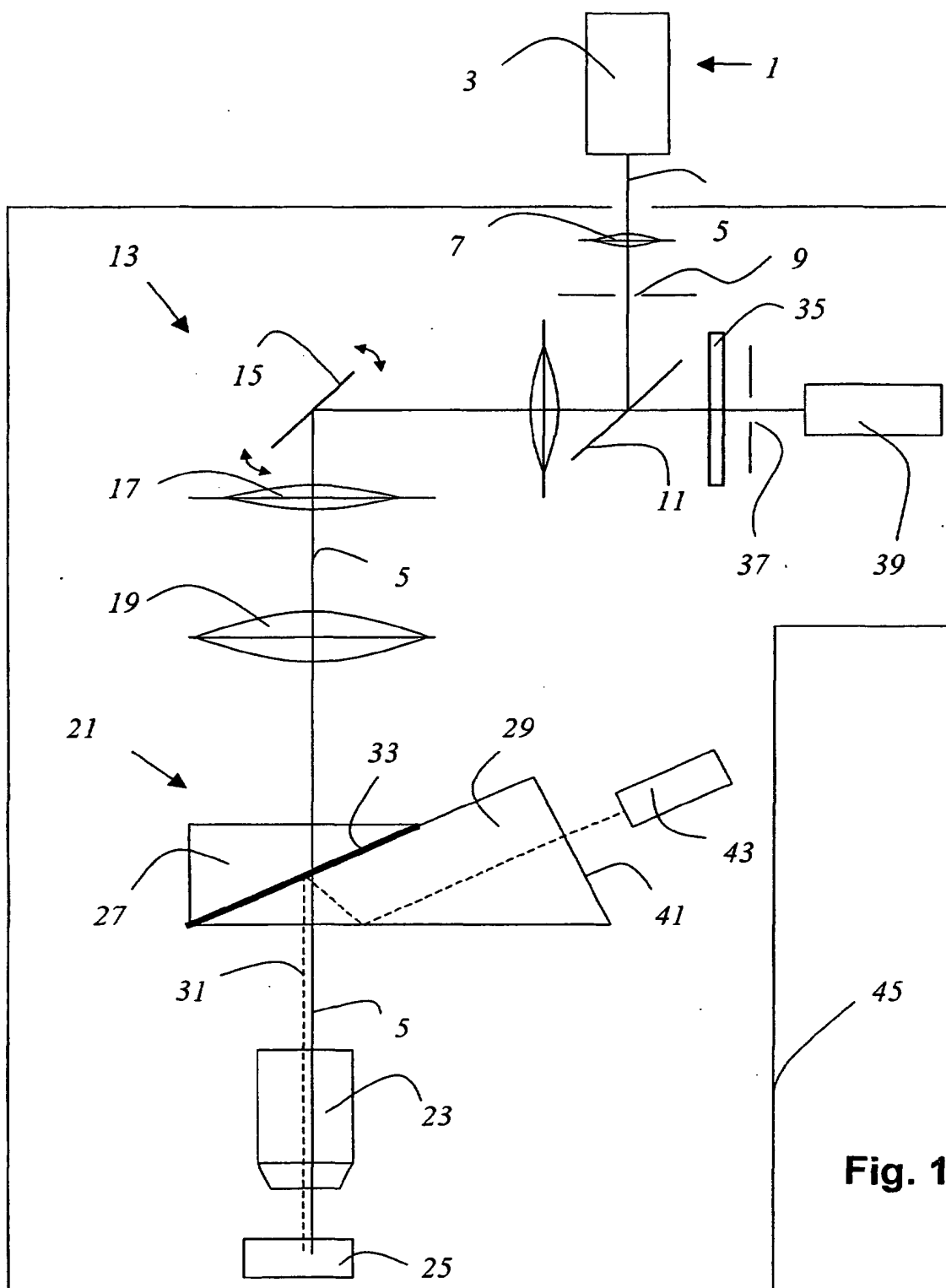


Fig. 1

DE 202 06 153 U1

19.04.02

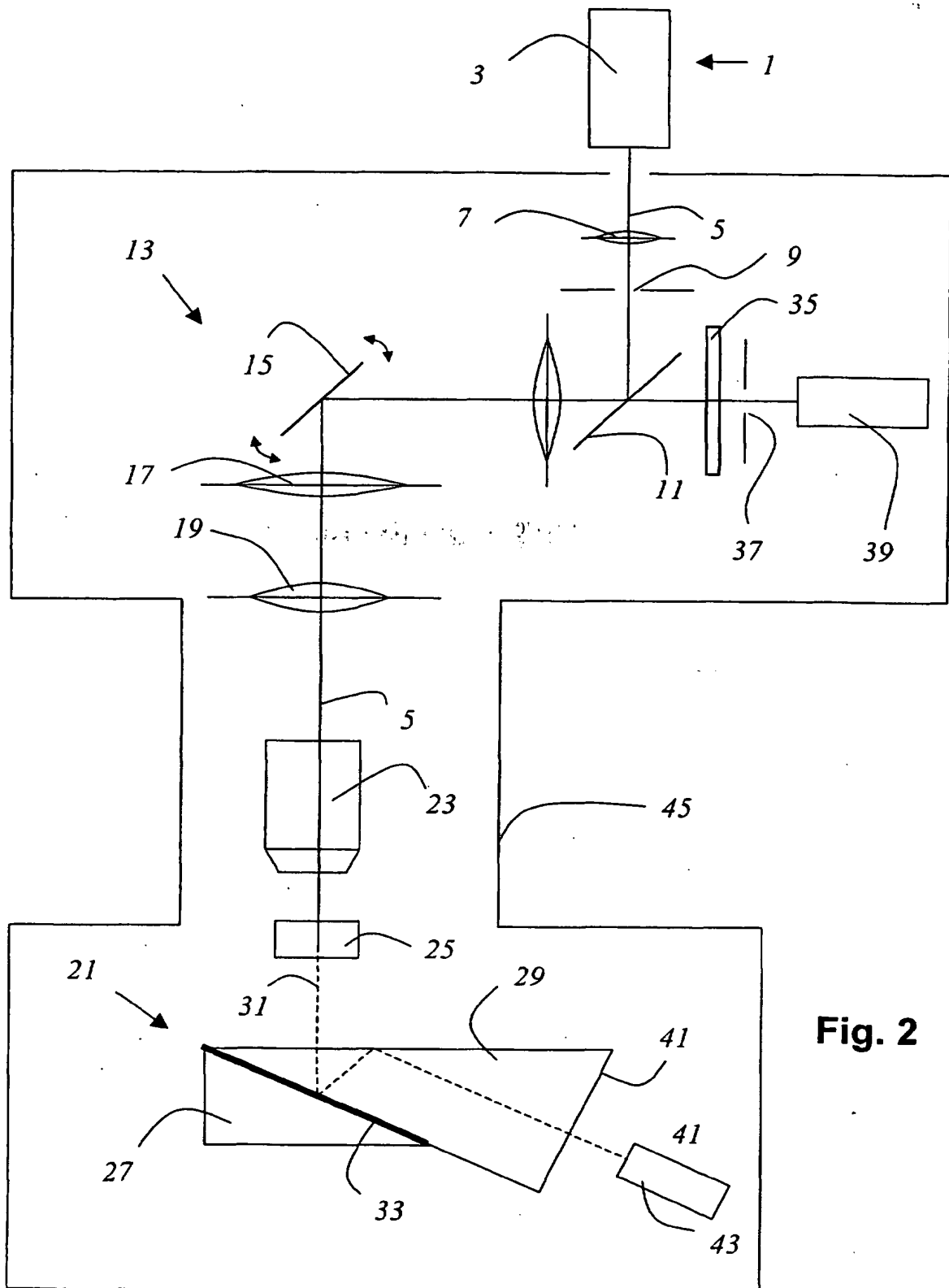


Fig. 2

DE 202 06 153 U1

THIS PAGE BLANK (USPTO)